

PATENT APPLICATION

published according to § 31 of Law No. 527/1990 Sb.

(21) Document number

2000 – 2680

(19)
CZECH
REPUBLIC

(22) Filed: **07.21.2000**

(40) Date of publication of application: **03.13.2002**
(Gazette No. 3/2002)

(13) Type of document: **A3**

(51) Int. Cl.⁷:

C 07 K 5/12

//(A 61 K 38/12, A 61 P 25/16, A 61 P 25/28, A 61 P 29/00, A 61 P 11/00, A 61 P 27/12, A 61 P 9/10)

OFFICE
OF INDUSTRIAL
PROPERTY

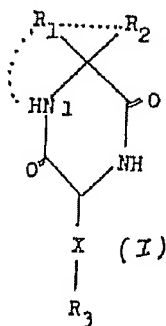
(71) Applicant
KASAFIREK, Evzen Ing. CSc., Prague, CZECH REPUBLIC;
FRIC Piemysl Prof. MUDr. Dr.Sc., Prague, CZECH REPUBLIC;
TOMASOVA Helena Prof. RNDr. CSc., Prague, CZECH REPUBLIC;

(72) Inventors:
Kasfirek, Evzen Ing., CSc. Prague, CZECH REPUBLIC;
Fric Piemysl Prof. MUDr. Sr Sc., Prague, CZECH REPUBLIC;
Tomasova Helena Prof. RNDr. SCs.,Prague, CZECH REPUBLIC;

(54) Title of the invention:
Cyclic alkylthiopeptides

(57) Summary

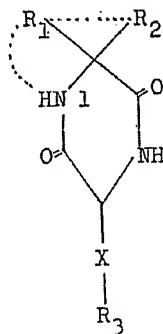
Cyclic alkylthiopeptides of general formula I are antioxidant compounds, which protect the amino acid methionine from oxidation, which is contained in a number of biologically active peptides, for example, in α_1 -trypsin inhibitor or amyloid β -peptide. These compounds have the function of radical scavengers and can block and/or completely eliminate oxidation of a methionine and preserve the original activity of the biologically active peptide; they can be used in the production of pharmaceutical preparations in solid or liquid forms of administration for treatment of different inflammations and Alzheimer's disease.



Cyclic alkylthiopeptides

Field

The invention concerns cyclic alkylthiopeptides of the general formula



where

R_1 and R_2 denote the same or different C_1 to C_7 alkyls, straight-chain or branched, or joined by a chemical bond, in which one of these substituents or both can denote a hydrogen atom, R_2 denotes phenylmethyl, 4-hydroxyphenylmethyl, phenyl, 4-hydroxyphenyl, δ -guanidinopropyl, hydroxymethyl, carboxamidomethyl, 2-carboxamidoethyl, ϵ -aminobutyl or methylthioethylene, if R_2 is a hydrogen atom, R_1 can form a trimethylene or methylenethiomethylene chain with a nitrogen atom in position 1, X denotes a sulfur atom or methylene group, R_3 denotes a C_1 to C_4 alkyl group or a C_1 to C_2 methylenethioalkyl group.

These new compounds have the function of radical scavengers and protect methionine from oxidation in biologically active peptides. They can be used to treat different inflammations (pancreatitis, gingivitis) chronic pulmonary diseases, cerebral aneurysms, ocular disorders (cataract), Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cerebral insults, etc.

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2680

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 21.07.2000

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.03.2002
(Věstník č. 3/2002)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 5/12

//(A 61 K 38/12, A 61 P 25/16, A 61 P 25/28,
A 61 P 29/00, A 61 P 11/00, A 61 P 27/12, A
61 P 9/10)

(71) Přihlašovatel:

KASAFÍREK Evžen Ing. CSc., Praha, CZ;
FRIČ Přemysl Prof. MUDr. DrSc., Praha, CZ;
TOMÁŠOVÁ Helena Prof. RNDr. CSc., Praha, CZ;

(72) Původce:

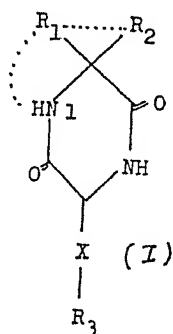
Kasafírek Evžen Ing. CSc., Praha, CZ;
Frič Přemysl Prof. MUDr. DrSc., Praha, CZ;
Tomášová Helena Prof. RNDr. CSc., Praha, CZ;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Cyklické alkylthiopeptidy

(57) Anotace:

Cyklické alkylthiopeptidy obecného vzorce I jsou antioxidační sloučeniny, které chrání před oxidací aminokyselinu methionin, který je obsažen v řadě biologicky aktivních peptidů, např. v α_1 -trypsin inhibitoru nebo amyloidním β -peptidu. Tyto sloučeniny mají funkci lapačů radikálů a mohou oxidaci methioninu blokovat a/nebo zcela eliminovat a zachovat biologicky aktivnímu peptidu jeho původní aktivitu; lze je použít k výrobě farmaceutických přípravků v pevných nebo tekutých dávkovacích formách k terapii různých zánětů a Alzheimerovy choroby.

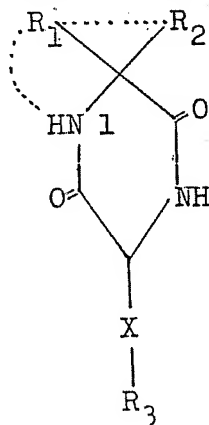


PV 2000 - 2680

Cyklické alkylthiopeptidy

Oblast techniky

Vynález se týká cyklických alkylthiopeptidů obecného vzorce



ve kterém

R_1 a R_2 značí stejné nebo různé alkyly C_1 až C_7 , přímé nebo rozvětvené, popř. spojené chemickou vazbou, přičemž jeden z těchto substituentů, popř. oba mohou značit atom vodíku, R_2 značí fenylmetyl, 4-hydroxyfenylmetyl, fenyl, 4-hydroxyfenyl, δ -guanidinopropyl, hydroxymetyl, karboxamidometyl, 2-karboxamidoetyl, ϵ -aminobutyl anebo metylthioetylen, je-li R_2 atom vodíku, může R_1 tvořit trimetylenový, popř. metylenthioetylenový řetězec s atomem dusíku v poloze 1, X značí atom síry nebo metylenovou skupinu, R_3 značí alkylovou skupinu C_1 až C_4 nebo metylenthioalkylovou skupinu C_1 až C_2 .

Tyto nové sloučeniny mají funkci radikálového scavengeru a chrání methionin před oxidací v biologicky aktivních peptidech. Lze je použít k léčbě při různých zánětech (pankreatitidy, gingivitidy), chronických plicních onemocněních, mozkových výdutích, očních poruchách (šedý zákal), Alzheimerově chorobě, Parkinsonově chorobě, mozkové příhodě a pod.

Dosavadní stav techniky

Některé aminokyseliny nebo peptidy, navržené jako antioxi-
dační sloučeniny, chrání před oxidací a zároveň i před inaktivací
methionin (Met^{358}) v přirozeném endogenním inhibitoru proteináz;
tento tzv. α_1 -trypsin inhibitor ($\alpha_1\text{-PI}$) je nejúčinnějším při-
rozeným inhibitorem serinových proteináz, např. trypsinu, chymo-
trypsinu, leukocytární a pankreatické elastázy. Zmíněné proteo-
lytické enzymy jsou výraznými iniciátory různých zánětlivých
onemocnění, např. pankreatitidy, revmatoidní artritidy apod.
Aminokyseliny nebo peptidy, dosud navrhované jako antioxi-
dační sloučeniny k potenciální ochraně Met^{358} v $\alpha_1\text{-PI}$, např. N-ace-
tylcystein, methionin nebo glutathion (Agents & Action 22, 255-260 /
/1987/), i když blokují oxidaci methioninu v $\alpha_1\text{-PI}$, mají takové
chemické struktury, které jsou relativně málo stálé, mají krátký
biologický poločas a vysoký clearance.

Podstata vynálezu

S překvapením bylo zjištěno, že cyklické alkylthiopeptidy
uvedeného vzorce, v němž substituenty mají výše uvedený význam,
jsou enzymaticky rezistentní sloučeniny, jejichž přítomné alkyl-
sulfidické ligandy fungují jako scavengery a brání tak oxidaci
methioninu na methioninsulfoxid v celé řadě biologicky aktivních
peptidů, zvláště pak $\alpha_1\text{-PI}$ (BioFactors 3, 91-96 /1991/); oxi-
dace methioninu v biologicky aktivních peptidech souvisí s celou
řadou závažných onemocnění, jak již bylo zmíněno výše.

Význam methioninu, resp. jeho důležitost se uplatňuje i u
amyloidního β -peptidu, který je součástí amyloidního plaku při
Alzheimerově chorobě. Neurotoxická $\text{A}\beta$ peptidu (1-40) anebo jeho
fragmentu $\text{A}\beta$ (25-35) je spojena s oxidací methioninu (Met^{35}) v
odpovídající methioninsulfoxid. Je zde proto předpoklad, že lát-
ky, které budou mít funkci radikálového scavengeru, mohou oxi-
daci Met^{35} blokovat anebo zcela eliminovat. Sloučeniny s tako-
vými vlastnostmi je pak možné využít v terapii Alzheimerovy cho-
roby.

Vzhledem k rigidní chemické struktuře, jsou cyklické alkyl-
thiopeptidy uvedeného obecného vzorce stabilní sloučeniny, což
umožňuje jejich účelné použití v léčivech k terapii již zmíněných

onemocnění; s výhodou je lze aplikovat perorálně v pevných lékových formách, jako jsou enterosolventní tablety, tobolky nebo vodné suspenze s hodnotou pH 6 až 8, popř. i rektálně, rovněž ve formě vodné suspenze s hodnotou pH 6 až 8 nebo ve formě suspenze olejové.

Ochrana Met³⁵⁸ v α_1 -trypsin inhibitoru (α_1 -PI) sirnými sloučeninami obecného vzorce podle vynálezu před oxidací na methioninsulfoxid byla hodnocena postupem jak je uvedeno v Agents & Action 22, 255-260 (1987) s tím rozdílem, že ke sledování inhibice α_1 -PI byl použit trypsin a jeho zbytková aktivita byla stanovena chromogenním substrátem p-nitroanilidem N^α-tosyl-L-argininu (L-TAPA). Jako srovnávací sloučeniny byly použity N-acetyl-L-cystein (konc. 3 mg/l ml) a oxidovaný glutathion (konc. 10 mg ve fyziologickém roztoku). Hodnoceny byly sloučeniny podle vynálezu: cyklo(Acp-Met) IIa, cyklo(Acp-Cys/Et/) IIc, cyklo(Acp-Cys/Bu/) IIe; všechny v koncentraci 2 mg/l ml DMFA.

Uspořádání pokusu bylo provedeno tak, že roztok α_1 -PI (SERVA) o konc. 10 mg/50 ml TRIS pufru o pH 7,1 byl oxidován 3% peroxidem vodíku. V pokusech, při kterých bylo dosaženo 50 % inhibice trypsinu částečně inaktivovaným (oxidovaným) α_1 -PI, bylo za stejných oxidačních podmínek v přítomnosti sirných sloučenin podle vynálezu, zvýšena inhibiční schopnost α_1 -PI jak je uvedeno v Tabulce III

Tabulka III

Sirné sloučeniny	Zvýšení inhibice α_1 -PI
N-Acetyl-L-cystein	18 %
Glutathion oxidovaný	14 %
IIa cyklo(Acp-Met)	22 %
IIc cyklo(Acp-Cys/Et/)	20 %
IIe cyklo(Acp-Cys/Bu/)	14 %

Všechny meziprodukty a konečné látky byly připraveny syntézou v roztoku obvyklými metodami užívaných v chemii peptidů. Tyto sloučeniny je možné také připravit syntézou v pevné fázi, popř. syntézou pomocí enzymů.

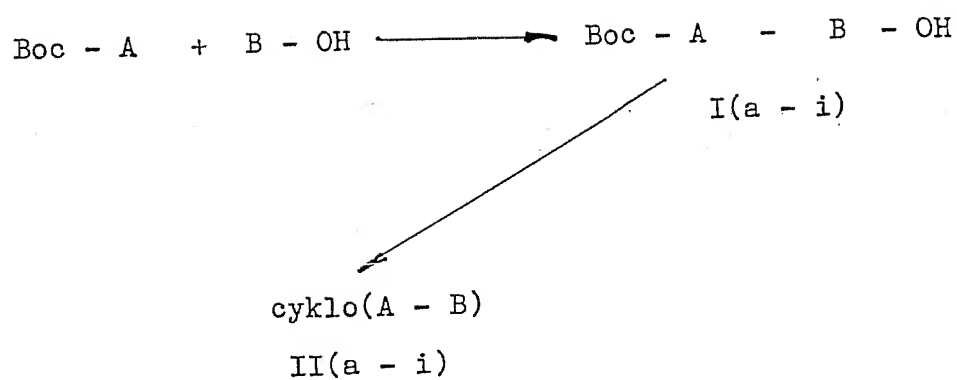
Syntetický postup přípravy sloučenin obecného vzorce podle vynálezu představuje Schema 1. Analytická data (T.t.) meziproduktů I(a-i) a konečných látek II(a-h) jsou uvedena v Tabulce I. resp. v Tabulce II.

Vynález cyklických alkylthiopeptidů je blíže ilustrován, ale nijak omezen, v následujících příkladech provedení:

Použité zkratky a symboly mají následující význam:

Acp	= kyselina l-amino-l-cyklopentankarboxylová
Met	= methionin
Cys(Me)	= S-methylcystein
Cys(Et)	= S-ethylcystein
Cys(Pr)	= S-propylcystein
Cys(Bu)	= S-butylcystein
Ala	= alanin
Phe	= fenylalanin
Boc	= tert.butyloxykarbonyl
CDI	= N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
OH-Suc	= N-hydroxysukcinimid
DMFA	= dimetylformamid

Schema 1



I, II	A	B
a	Acp	Met
b	Acp	Cys(Me)
c	Acp	Cys(Et)
d	Acp	Cys(Pr)
e	Acp	Cys(Bu)
f	Met	Ala
g	Phe	Met
h	Cys(Et)	Ala
i	Met	Acp

Příklady provedení

Příklad 1

Boc-Acp-Met-OMe (Ia)

K roztoku 4,6 g Boc-Acp (20 mmol) a 2,3 g OH-Suc v 50 ml DMFA ochlazeném na 0° C byl přidán 4,4 g CDI. Po 1 h míchání a chlazení při 5 °C byl přidán roztok Met-OMe ve 20 ml DMFA, uvolněného z odpovídajícího hydrochloridu (2,4 g; 20 mmol) N-etylpiperidinem (2,8 ml; 20 mmol). Po 2 h míchání za teploty místnosti byla vyloučená N,N'-dicyklohexylmočovina odfiltrována, filtrát byl vakuově odpařen, odparek byl rozpuštěn v octanu etylnatém a postupně vytřepán 1% kyselinou citronovou (3x), vodou, 5% hydrogenuhlíčanem sodným (3x), vodou, vysušen bezvodým síranem sodným a odpařen. Pevný odparek byl krystalován ze směsi 30 ml octanu etylnatého a 200 ml petrol-eteru. Bylo získáno 6,35 g (85 % hmot.) (Ia) o t.t. 133-136 °C. Obdobným postupem byly připraveny sloučeniny I(b-i) uvedené v Tabulce I.

Cyklo(Acp-Met) (IIa)

K roztoku 3,75 g Boc-Acp-Met-OMe (10 mmol) ve 20 ml led. kyselině octové bylo přidáno 17 ml roztoku HCl/v kyselině octové (0,6 M). Po 2 h míchání reakčního roztoku za teploty místnosti, byl roztok vakuově odpařen, odparek byl rozpuštěn v 50 ml metanolu a znovu odpařen; potom byl odparek rozpuštěn ve 30 ml metanolu a deionizován na sloupci slabě bazického anexu L 150. Metanolicke eluáty byly odpařeny a pak ještě odpařeny (2x) se směsí metanol - toluen (10:1) a nakonec byl odparek rozpuštěn v 25 ml octanu etylnatého a ponechán 24 h za teploty místnosti. Vyloučený krystalický produkt byl odfiltrován a promyt eterem. Bylo získáno 1,65 g (68 % hmot.)(IIa) o t.t. 243-246 °C. Obdobným postupem byly připraveny sloučeniny II(b-h) uvedené v Tabulce II.

Tabulka I

I(a - i)		Teplota tání °C
Ia	Boc-Acp-Met-OMe	133-136
Ib	Boc-Acp-Cys(Me)-OMe	126-128
Ic	Boc-Acp-Cys(Et)-OMe	132-134
Id	Boc-Acp-Cys(Pr)-OMe	129-131
Ie	Boc-Acp-Cys(Bu)-OMe	119-122
If	Boc-Met-Ala-OMe	84-86
Ig	Boc-Phe-Met-OMe	olej
Ih	Boc-Cys(Et)-Ala-OMe	74-77
Ii	Boc-Met-Acp-OMe	127-129

Tabulka II

II(a - h)		Teplota tání °C
IIa	cyklo(Acp-Met)	243-246
IIb	cyklo(Acp-Cys/Me/)	237-238
IIc	cyklo(Acp-Cys/Et/)	220-221
IId	cyklo(Acp-Cys/Pr/)	227-228
IIe	cyklo(Acp-Cys/Bu/)	202-204
IIf	cyklo(Met-Ala)	243-246
IIg	cyklo(Phe-Met)	261-262
IIh	cyklo(Cys/Et/-Ala)	233-235

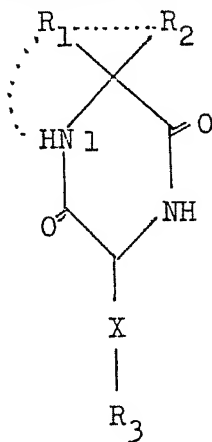
Průmyslová využitelnost

Tento vynález se týká použití cyklických alkylthiopeptidů uvedeného obecného vzorce k výrobě farmaceutických přípravků, určených k ochraně methioninu před jeho oxidací na odpovídající methioninsulfoxid. Methionin je vestavěn v biologicky aktivních peptidech, např. v α_1 -trypsin inhibitoru (pozice Met³⁵⁸) nebo v amyloidním β -peptidu (pozice Met³⁵); oxidací na methioninsulfoxid dochází k ztrátě biologické aktivity. Sloučeniny podle vynálezu lze aplikovat perorálně nebo rektálně v pevných nebo tekutých dávkovacích formách, které lze vyrábět způsoby, běžnými ve farmaceutickém průmyslu.

PV 2000-2680

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

Cyklické alkylthiopeptidy obecného vzorce



ve kterém

R_1 a R_2 značí stejné nebo různé alkyly C_1 až C_7 , přímé nebo rozvětvené, popř. spojené chemickou vazbou, přičemž jeden z těchto substituentů, popř. oba mohou značit atom vodíku, R_2 značí fenylmetyl, 4-hydroxyfenylmetyl, fenyl, 4-hydroxyfenyl, δ -guanidinopropyl, hydroxymetyl, karboxamidometyl, 2-karboxamidoetyl, ϵ -aminobutyl anebo metylthioetylen, je-li R_2 atom vodíku, může R_1 tvořit trimetylenový, popř. metylenthioetylenový řetězec s atomem dusíku v poloze 1, X značí atom síry nebo metylenovou skupinu, R_3 značí alkylovou skupinu C_1 až C_4 nebo metylenthioalkylovou skupinu C_1 až C_2 .